Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Versuche zur Blutmengenbestimmung in Blutflecken und Erdproben mittels der Guajakol – und der Pyridinhämochrom-Methode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philippsuniversität Marburg an der Lahn

vorgelegt von

Helmut van Wasen
aus Weidenau

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Versuche zur Blutmengenbestimmung in Blutflecken und Erdproben mittels der Guajakol – und der Pyridinhämochrom-Methode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philippsuniversität Marburg an der Lahn

vorgelegt von

Helmut van Wasen

aus Weidenau

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 13. Nov. 1969

gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Korreferent: Doz. Dr. med. W. Wesemann

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhalt

A. Einleitung 7
B. Die Guajakol-Methode 1o
I. Allgemeine Grundlagen und Literatur 1o
II. Eigene Versuche 15
1. Reagentien und Material 15
2. Vorversuche zur Ermittlung einer Eichkurve . . 16
3. Hauptversuche 25
a) Blutmengenbestimmung von Blutflecken aus Textilien 25
b) Blutmengenbestimmung an blutgetränkten Erdproben 29
4. Besprechung 32
C. Die Pyridinhämochrom-Methode 35
I. Allgemeine Grundlagen und Literatur 35
II. Eigene Versuche 39
1. Vorversuche anhand der Literatur 39
a) Nach der Methode von FLINK und WATSON . . . 39
b) Nach der Methode von DE DUVE 43
2. Ermittlung einer Eichkurve 46
3. Hauptversuche 5o
a) Blutmengenbestimmung von Blutflecken aus Textilien 5o
b) Blutmengenbestimmung an blutgetränkten Erdproben 53

4. Besprechung 55
D. Zusammenfassung 58
E. Literatur 6o

A. Einleitung

Seit Anfang des Jahrhunderts haben sich zahlreiche Autoren bemüht, Blutextravasate quantitativ zu bestimmen. Als Trägermaterialien kommen Textilien, Holz, Erde oder glatte, undurchlässige Flächen in Frage. Eine Zusammenstellung der für die gerichtlich-medizinische Praxis beschriebenen Methoden (bis 1966) findet sich bei SCHLEYER, eine Zusammenstellung der Methoden der operativen Fächer zur Messung des Blutverlustes bei von HANSEN.

Von HANSEN selbst arbeitete mit einer 2% Benzidin-Lösung, o.6% und 3% Peroxid-Lösung und einer Grundverdünnung von zitriertem Rinder- oder Menschenblut. Das bereits von anderen Autoren beobachtete "Auslöschphänomen" der Peroxidase-Reaktion bei Anwesenheit von Serum umging er durch Benutzung einer Vergleichskurve aus Vollblut an Stelle von reinen Hämoglobin-Lösungen. Trotzdem ergaben sich bei Blutmengenbestimmungen an Blutflecken in Textilien Ausbeutedefizite von durchschnittlich 2o%. Somit erwies sich die Technik als nicht besser als die älteren Verfahren. Von HANSEN erklärt die hohen Defizite durch die nichtoptimale wässerige Extraktion der Blutflecken. Eine schwachalkalische Lösung als Extraktionsmittel kam aber aus methodischen Gründen für das Benzidinverfahren nicht in Frage.

KAPPERT versuchte eine Blutmengenbestimmung aus Stoff-Flecken über den Eisengehalt des Blutes, was am nächsten liegt. Zu diesem Zwecke wurde das Untersuchungsmaterial verascht und der Eisengehalt des Veraschungsproduktes mit der Ortho-Phenantrolin-Reaktion kolorimetrisch bestimmt. KAPPERT erzielte mit dieser Methode hohe Ausbeuten von fast 100%. Ein großer Vorteil liegt in ihrer Unabhängigkeit von äußeren Einwirkungen wie Alter, Temperatur und Belichtungszeit des Untersuchungsmaterials. Allerdings kann sie nicht an Erdproben angewandt werden.

SCHLEYER (1968) hat eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Blutextravasaten beschrieben, bei der Das Hämoglobin in Cyanhämiglobin überführt und photometrisch bestimmt wird. Der gesuchte Blutgehalt, beispielsweise eines Stoff-Fleckens, wird dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ml Blut} = \frac{\text{Extinktion} \cdot 0.35 \cdot \text{ml Extrakt}}{\text{g/100 ml Hb}}$$

SCHLEYER bestimmte mit dieser Methode Blutmengen aus Stoff-Flecken, von undurchlässigen Flächen und aus verschiedenen Erdproben. Die Ausbeutedefizite lagen zum Teil erheblich unter denen früher beschriebener Verfahren. Die Ausbeute nahm allerdings mit dem Alter des Untersuchungsmaterials ab. Bei einem Alter der Blutspur von 2-7 Tagen betrugen die Ausbeutedefizite im Mittel

für Stoff -5%, für Glasflächen -1%, für Erde (je nach Art der Probe) zwischen -9 und -27%.

Aufgabe dieser Arbeit war es, eine Blutmengenbestimmung mit der Guajakol-Methode und als Pyridinhämochrom zu versuchen.

B. Die Guajakol-Methode

I. Allgemeine Grundlagen und Literatur

Guajakol (Brenzkatechinmonomethyläther) ist ein Brenzkatechinderivat und gehört somit in die Reihe der Phenole. Es wurde zum ersten Male unter den Destillationsprodukten des Guajakharzes gefunden. Als Phenol besitzt es die Eigenschaft, durch den Luftsauerstoff sehr schlecht autoxydabel zu sein. Mittels Hämoglobin oder seiner Derivate, deren Peroxidaseaktivität als Katalysator bekannt sind, läßt sich die Oxydation von Guajakol durch Wasserstoffperoxid zu Tetraguajakol stark beschleunigen und die Bildung des Farbkomplexes spektrophotometrisch verfolgen.

Bei der quantitativen Spektralphotometrie wird die Intensitätsabnahme des Lichtes beim Durchgang durch die Meßlösung bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Die relative Abnahme der Intensität monochromatischen Lichtes beim Durchgang durch eine Lösung von der Schichtdicke d cm wird von der Konzentration an absorbierender Substanz bestimmt. Die Beziehungen zwischen den verschiedenen Größen werden in den BOUGUER-LAMBERT-BEER schen Gesetz ausgedrückt:

$$E = \log \frac{Io}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

Io= Intensität des eintretenden Strahles

I = Intensität des austretenden Strahles

ε = Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke der Lösung

Soll die Peroxidase-Reaktion zwischen Guajakol, Blut und Peroxid zur Blutmengenbestimmung herangezogen werden, so muß die Voraussetzung erfüllt werden, daß die Intensität des entstehenden Farbkomplexes bei gleichen Guajakol- und Peroxidmengen und sonst gleichen Versuchsbedingungen von der Menge des zugegebenen Blutes bestimmt wird.

Ergibt sich zwischen den gemessenen Extinktionen und den verwendeten Blutmengen eine gesetzmäßige, d.h. reproduzierbare Beziehung, so läßt sich mit Hilfe dieser beiden Größen eine Eichkurve für die Bestimmung unbekannter Blutmengen erstellen. In einem Koordinatensystem werden die Extinktionen gegen die entsprechenden Blutmengen aufgetragen.

Die Extinktion wird wegen der endlichen Spaltbreite bei den Wellenzahlen gemessen, bei denen sie sich am wenigsten mit der Wellenzahl ändert, also im Absorptionsmaximum. Das Absorptionsmaximum für Tetraguajakol wird in der Literatur bei einer Wellenlänge von 47o nm angegeben.

CONNELL und SMITHIES nutzten diese Peroxidase-Reaktion zur quantitativen Bestimmung von menschlichem Serumhaptoglobin. Haptoglobine sind Proteine, die sich mit Hämoglobin oder gewissen Hämoglobin-Derivaten verbinden. Die Methode wird gegen ein Standardhämoglobin geeicht, so daß der Haptoglobingehalt einer Lösung in Form seines Hämoglobinbindungsvermögen ausgedrückt werden kann.

Das Guajakol-Reagens stellten CONNELL und SMITHIES folgendermaßen her: 1.86 g Guajakol und 5o ml 1 mol Essigsäure werden in 4oo ml Wasser gelöst; der pH wird mit 1 mol NaOH auf 4.o eingestellt und abschließend das Volumen auf 5oo ml aufgefüllt. Dies entspricht einer Guajakolkonzentration von 27.5 mmol/l. Versuche mit niedrigeren Konzentrationen zeigten, daß im menschlichem Serum Substanzen vorhanden sind, die die Bildung der Farbkomplexe bei den Peroxidase-Reaktionen zu hemmen vermögen. Von anderen Autoren wurde dieses "Auslöschphänomen" ebenfalls beobachtet (s.o.). Guajakol erwies sich bei einer Konzentration von 27.5 mmol/l als ausreichend, diesen Serumeffekt vollständig zu überwinden.

Das pH-Optimum liegt für die Bestimmung von freiem Hämoglobin bei 5.3. Bei Anwesenheit von Haptoglobin steigt jedoch die Peroxidaseaktivität bis zu einem pH von 4.o. Bei noch stärker sauren Lösungen verhindert

das rasche Verblassen von Tetraguajakol eine exakte Bestimmung.

Das Hydrogenperoxid wurde durch Verdünnen einer Perhydrolstammlösung (3o%) hergestellt. Die Farbbildung reagiert sehr empfindlich auf Änderungen der Peroxidkonzentrationen. Die Standardbestimmungen wurden mit einer o.o1 mol H_2O_2-Lösung gemacht. Wichtig ist fernerhin, daß die Lösung unmittelbar vor Gebrauch angesetzt wird und notfalls nach 3o min durch eine frische ersetzt wird.

SMITH und OWEN und OWEN,BETTER und HOBAN versuchten ebenfalls eine Haptoglobinbestimmung mit der Guajakol-Reaktion. Sie stellten das Guajakol-Reagens nach der von CONNELL und SMITHIES angegebenen Methode her, wählten jedoch eine Peroxidkonzentration von o.o5 mol/l für ihre Versuche. Bezüglich der Abhängigkeit des Reaktionsablaufes vom Alter des Guajakol-Reagens stellten sie folgendes fest: Lagerung der Lösung bei Raumtemperatur in diffusem Tageslicht für 12 Tage bedingt eine Steigerung der Peroxidaseaktivität um das 2-4fache, für 2o Tage um das 4-6fache. Aufbewahrung bei $2^{o}C$ vermindert diesen Effekt, hebt ihn jedoch nicht auf. Bei langer Lagerung nimmt die Guajakol-Lösung einen bräunlichen Farbton an. Es scheint daher möglich, daß ein Oxidationsprodukt von Guajakol die weitere Oxidation durch Peroxid in Anwesenheit von Peroxidase steigert.

Weiterhin beschrieben SMITH und OWEN die Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von der Zeit. Sie stellten fest, daß bei 25°C ein Maximum der Farbentwicklung nach 1o min erreicht wurde, 1-2 min konstant blieb und dann langsam wieder abfiel. Bei höherer Temperatur wurde schneller ein niedrigeres Maximum für kürzere Zeit erreicht, bei niedrigerer Temperatur langsamer ein höheres Maximum für längere Zeit.

Zwei Tatsachen können wohl für das rasche Nachlassen der Farbentwicklung verantwortlich gemacht werden. Erstens bedingt die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid eine Zerstörung der Peroxidaseaktivität des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes, und zweitens ist das entstehende Tetraguajakol nicht stabil (SMITH und OWEN).

Alle erwähnten Autoren geben das Absorptionsmaximum für Tetraguajakol bei 47o nm an. Den Vorteil ihrer Methode gegenüber früher beschriebenen sehen die Autoren in einer einfachen, schnellen und zuverlässigen Haptoglobinbestimmung.

II. Eigene Versuche

1. Reagentien und Material

Das Guajakol-Reagens wurde in Anlehnung an OWEN, BETTER und HOBAN hergestellt: 2.o g kristallines Guajakol wurden unter leichtem Erwärmen in 35o ml Aqua dest. gelöst. Es wurden 5o ml 1 M Essigsäure hinzugegeben, der pH mit 1 M NaOH mit Hilfe eines Glaselektroden-pH-Meters auf 4.o eingestellt und das Volumen der Lösung mit Aqua dest. auf 5oo ml aufgefüllt. Das Reagens wurde kühl aufbewahrt und bei Anzeichen einer Braunfärbung durch frisches ersetzt.

Das Peroxid wurde durch Verdünnen einer Stammlösung 3o% (Perhydrol) mit Aqua bidest. hergestellt. Der Metallionengehalt normal destillierten Wassers kann sich ungünstig auf die Stabilität der Lösung auswirken (v. HANSEN). Der Peroxid wurde für die einzelnen Versuche jedesmal frisch angesetzt, um Fehlbestimmungen wegen Überalterung vorzubeugen.

Das Blut stammte von Schlachthof-Rindern. Es wurde nach Tötung der Tiere durch Kehlschnitt in silikonisierten Glasgefäßen mit Na-Zitratvorlage ungerinnbar aufgefangen. Die für die Versuche gewünschten Lösungen wurden nach Verdünnen des Vollbltues mit Aqua dest. hergestellt.

Die Extinktionen wurden mit dem Spektrophotometer "ZEISS-OPTON" gemessen. Die Schichtdicke der Küvetten betrug 1 cm. Die Küvetten wurden über Nacht in Chromschwefelsäure aufbewahrt, vor Gebrauch mehrmals mit Aqua dest. kräftig gespült und schlierenfrei getrocknet.

2. Vorversuche zur Ermittlung einer Eichkurve

Zur groben Orientierung wurden zunächst von Vollblutverdünnungen 1:1oo und 1:3oo je 1.o ml in Reagensgläser pipettiert. Als Blindwert diente 1.o ml Aqua dest. Es wurden je 5.o ml des bereiteten Guajakol-Reagens und 1.o ml o.o5 mol H_2O_2 hinzugefügt. Die Proben wurden vorsichtig gemischt. Unmittelbar nach Zugabe des Peroxids entwickelte sich in den beiden Reagensgläsern mit Blut eine rasch zunehmende Braunfärbung. Die Blindwert- und 1. Meßlösung wurden in die Küvetten eingefüllt. Die Wellenlänge wurde am Monochromator des Photometers auf 47o nm eingestellt, bei abgedunkelter Photozelle der Dunkelstrom auf Null kompensiert und bei geöffnetem Lichtstrom mit der eingeschobenen Blindwertlösung die lichtelektrische Anzeige auf 1oo% durch Veränderung der Spaltbreite und Anzeigeempfindlichkeit geregelt. Dann wurde bei dieser Einstellung die Küvette mit dem Blutzusatz in den Strahlengang eingeschoben.

Der Zeiger schnellte über die Extinktionsskala hinaus. Bei der 2. Probe mit der Blutverdünnung 1:3oo ging der Ausschlag langsamer und nur bis zu dem Extinktionswert 2.o.

Diese Beobachtung ließ eine Abhängigkeit der Reaktion von der Konzentration der zugegebenen Blutlösung vermuten. Im folgenden Versuch wurde deshalb mit Blutverdünnungen von 1:5oo und 1:1ooo gearbeitet. Im übrigen wurde wie beim vorangehenden Versuch verfahren. Es zeigte sich, daß bei einer Blutverdünnung von 1:5oo ebenfalls keine brauchbaren Werte zu erwarten sind, während bei der 1:1ooo-Verdünnung die Extinktion nach etwa 1o min einen Wert von o.93 erreichte. Für die weiteren Versuche wurde die Blutverdünnung von 1:1ooo beibehalten. Als Blindwert diente immer eine Wasser-Guajakol-H_2O_2-Mischung.

Bevor weitere Versuche gemacht wurden, um die optimalen Mengen der Reaktionsteilnehmer zu ermitteln, wurde das in der Literatur angegebene Absorptionsmaximum für Tetraguajakol nachgeprüft. Zu diesem Zweck wurden o.5 ml Blutlösung in ein Reagensglas pipettiert und auf 1.o ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Es wurden o.5 ml gewählt, um Werte im mittleren Bereich der Extinktionsskala zu erhalten. Die im vorangehenden Versuch angegebenen Mengen für Guajakol und Peroxid wurden beibehalten. Nach der Peroxidzugabe wurde 1o min gewartet

und dann so schnell wie möglich die Extinktion ($E \cdot 10^3$) im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500 nm im Abstand von 10 nm gemessen.

Die aus Tab. 1 ersichtlichen Werte bestätigen ein Absorptionsmaximum für Tetraguajakol bei einer Wellenlänge von 470 nm.

Tab. 1. Messung der Extinktion ($E \cdot 10^3$) von Tetraguajakol bei verschiedenen Wellenlängen

nm	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
$E \cdot 10^3$	310	320	350	370	370	400	500	570	550	540	460

Im folgenden Versuch wurde die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die Blutverdünnung war 1:1000 und die Peroxidkonzentration 0.05 M. Die Probe wurde angesetzt mit 1.0 ml Blut, 5.0 ml Guajakol und 1.0 ml H_2O_2. Die Wellenlänge wurde auf 470 nm eingestellt, und 2 min nach der Peroxidzugabe wurden die Extinktionen im Abstand von 1 min gemessen.

Das Ergebnis, ersichtlich aus Tab. 2 zeigt, daß bei den angegebenen Mengenverhältnissen die Reaktion nach 10 min ein Maximum erreichte. Nach einer Farbkonstanz von etwa 4-5 min Dauer setzte eine zunächst langsam, dann schneller zunehmende Abblassung ein. Bei einer Beobachtung der Reaktion über die nächsten 3 h

wurde eine in unregelmäßigen Abständen zu- und abnehmende Farbintensität festgestellt. Nach etwa 2 h war die Lösung makroskopisch fast farblos. Anschliessend entwickelte sich wieder eine Braunfärbung, ohne jedoch über einen längeren Zeitraum konstant zu sein.

Der nächste Versuch galt dem Ziele, die Dauer der Farbkonstanz zu verlängern, was vielleicht für die Hauptversuche mit Blutflecken von Vorteil sein konnte. Die Peroxidmenge wurde deshalb verringert, im 1. Ansatz auf o.5 ml und im 2. Ansatz auf o.25 ml. Die gemessenen Werte zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Reaktion von der verwendeten Peroxidmenge (s. Tab. 2). Bei niedriger Peroxidmenge wurde ein niedrigereres Maximum zu einem späteren Zeitpunkt erreicht: bei o.5 ml H_2O_2 betrug die maximale Extinktion nach 15 min o.85, bei o.25 ml nach 18 min o.75. Die eigentliche Erwartung, nämlich eine Verlängerung der Farbkonstanz, wurde jedoch nicht erfüllt.

Es scheint deshalb die Annahme berechtigt, daß die rasche Abblassung des Reaktionsproduktes nicht nur durch die Zerstörung der Peroxidaseaktivität durch Peroxid, sondern auch durch die Instabilität des Tetraguajakols bedingt wird.

Tab. 2. Extinktiosnmessung ($E \cdot 1o^3$) von Tetraguajakol zu verschiedenen Zeiten (t) nach Zugabe verschiedener Peroxidmengen: a) 1.o ml b) o.5 ml c) o.25 ml

t in min	$E_a \cdot 1o^3$	$E_b \cdot 1o^3$	$E_c \cdot 1o^3$
2	3oo	26o	172
3	435	344	221
4	556	418	26o
5	65o	475	319
6	76o	547	372
7	865	6oo	418
8	9oo	645	465
9	925	695	514
1o	93o	74o	558
11	93o	785	6oo
12	929	815	642
13	93o	838	675
14	93o	847	712
15	926	85o	725
16	914	85o	738
17	9o5	85o	745
18	89o	85o	75o
19	875	848	749
2o	86o	845	75o
21	855	835	75o
22	84o	83o	749
23	825	825	74o
24	815	818	735
25	8oo	81o	72o
3o	71o	735	668

In den folgenden Versuchen wurden deshalb die Proben mit 1.o ml o.o5 mol H_2O_2 angesetzt, und die Extinktionen wurden 1o min nach der Peroxidzugabe bei einer Wellenlänge von 47o nm gegen einen Reagentienblindwert gemessen.

Bei einer Meßreihe wurden 1o Proben mit gleichen Guajakol- und Peroxidmengen, jedoch mit steigenden Blutmengen von o.1-1.o ml im Abstand von o.1 ml angesetzt. Im Einzelnen wurde folgendermaßen verfahren:

1. Einpipettieren der Blutlösung (1:1ooo)
2. Auffüllen auf 1.o ml mit Aqua dest.
3. Einpipettieren von je 5.o ml Guajakol-Reagens
4. Mischen
5. Zugabe von je 1.o ml o.o5 mol H_2O_2
6. Mischen
7. Nach 1o min Messung der Extinktion

Die Werte, ersichtlich aus Tab. 3, lassen ein direkt proportionales Verhältnis zwischen den gemessenen Extinktionen und den angesetzten Blutmengen vermuten.

Tab. 3. Extinktionsmessung ($E \cdot 1o^3$) bei Blutmengen von o.1-1.o ml

ml Blut	o.1	o.2	o.3	o.4	o.5	o.6	o.7	o.8	o.9	1.o
$E \cdot 1o^3$	1o5	195	3oo	37o	481	595	673	75o	86o	99o

Außerdem lagen die Extinktionen auf dem gut ablesbaren Bereich auf der Skala des Gerätes. Für das Erstellen der Eichkurve wurde deshalb die oben beschriebene Methode zugrundegelegt. Mit der Cyan-Hb-Methode wurde der Hämoglobinwert eines frischen Rinderblutes zu 12.89 g Hb/1oo ml bestimmt, von jeder Blutcharge wurden 1o Proben angesetzt und gemessen. Die Mittelwerte der jeweils 1o Messungen wurden in einem Koordinatensystem gegen die entsprechenden Blutmengen aufgetragen (Tab. 4 und Abb. 1).

Die Standardabweichung (σ), als Maß für die Streuung der Einzelwerte (x) um den Mittelwert ($\bar{x}$) der jeweiligen Meßserie, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

und als Variationskoeffizient (V) ausgedrückt.

Tab. 4. 1o Meßreihen mit jeweils 1o Proben, o.1-1.d ml Blut (1:1ooo), Aqua dest. ad 1.o ml, 5.o ml Guajakol. 1.9 ml Peroxid (o.o5 mol), Extinktionsmessung ($E \cdot 1o^3$) bei 47o nm 1o min nach Peroxidzugabe gegen einen Reagentienblindwert, σ = Standardabweichung, V = Variationskoeffizient

Blutmenge in ml	o.1	o.2	o.3	o.4	o.5	o.6	o.7	o.8	o.9	1.o
1	95	191	285	365	481	573	652	772	89o	95o
2	96	19o	26o	371	47o	562	671	75o	842	94o
3	87	2o5	3o2	369	475	569	673	764	851	97o
4	91	184	28o	37o	5oo	57o	651	758	85o	95o
5	89	187	291	381	463	593	659	76o	872	99o
6	85	19o	284	352	472	552	664	762	864	94o
7	9o	2oo	283	368	484	57o	67o	781	847	98o
8	94	172	278	372	478	558	642	743	851	94o
9	98	19o	295	37o	475	595	66o	762	849	97o
1o	93	192	28o	377	473	569	661	76o	85o	96o
Mittelwert	92	19o	284	37o	477	571	66o	761	857	959
σ ($E \cdot 1o^3$)	3.9	8.4	1o7	7.3	9.4	132	9.4	1oo	139	17o
V in %	4.3	4.4	3.8	2.o	2.o	2.3	1.4	1.3	1.6	1.8

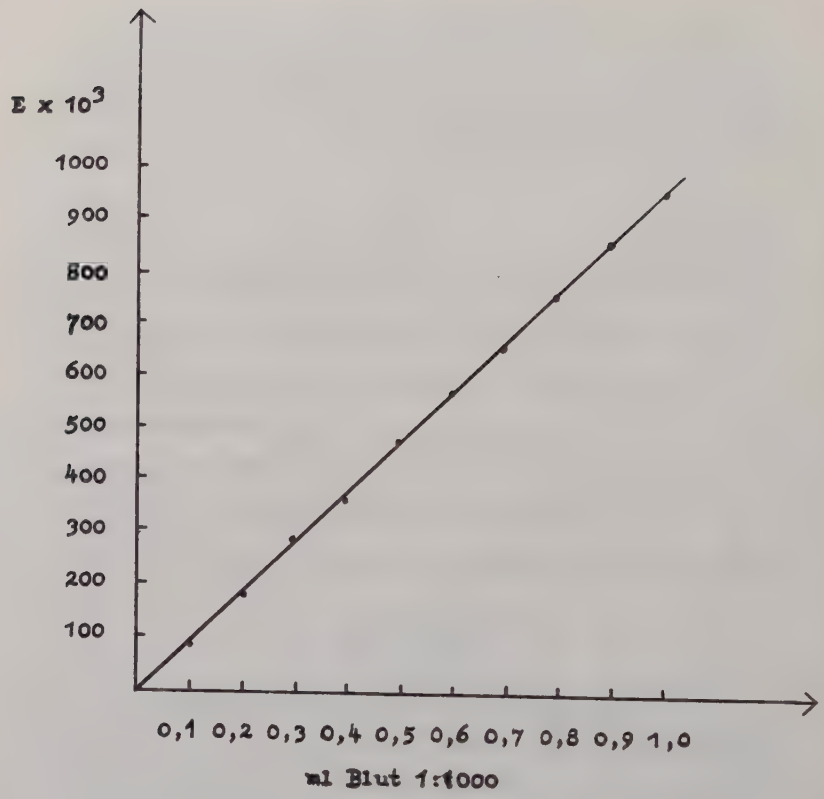

Abb. 1. Eichkurve für die Guajakol-Reaktion

3. Hauptversuche

a) Blutmengenbestimmung von Blutflecken auf Textilien

Die Blutflecken wurden mit dem Rindervollblut hergestellt, das in der Verdünnung 1:1ooo zum Erstellen der Eichkurve verwendet worden war. Es wurden 1o Flekken verschiedenen Blutgehaltes und somit verschiedener Größe auf sauberen, weißen Leinenstoff pipettiert. Die Blutmenge betrug zwischen o.5 und 2.5 ml. Die Blutflekken wurden beschriftet und zum Trocknen bei Raumtemperatur aufgehängt.

Nach 6 Tagen wurde der Blutgehalt der ersten 1o Flecken bestimmt. Das Blut wurde nach der von SCHLEYER beschriebenen Methode extrahiert: als Extraktionsmittel diente eine o.o4% NH_3-Lösung. Die ausgeschnittenen Flekken wurden kleingeschnitten und mit einer Analysenmühle (Hersteller: Janke & Kunkel, 7813 Staufen) in 2-3 min zu einem feinen Pulverisat zermahlen. Es empfiehlt sich, am Ende des Mahlvorganges eine Weile zu warten, bevor man die Mühle öffnet, um ein Hinauswirbeln des Pulverisates zu vermeiden. Es ist außerdem darauf zu achten, daß während des Mahlens der Mahlraum nach außen dicht abgeschlossen ist. Das Pulverisat wurde in ein Gefäß mit einer abgemessenen Menge an Extraktionsflüssigkeit übertragen. Die Mühle wurde mit kleinen, in Extraktions-

flüssigkeit getränkten Wattebäuschen sorgfältig von Blutflecken gereinigt.

Pulverisat und Wattebäusche wurden dann etwa 1 h mit der Extraktionslösung ausgelaugt, dann mit einer Pinzette ausgepreßt und mit der Wasserstrahlpumpe auf einer Fritte 3 G 2 mit abgemessenen Mengen NH_3-Lösung bis zur Entfärbung nachgewaschen. Der gesamte Verbrauch an Extraktionsflüssigkeit wurde notiert, und ein Teil des Gesamtextraktes wurde zur Beseitigung einer etwa noch vorhandenen Trübung durch Stoffreste scharf zentrifugiert.

Ein Aliquot des zentrifugierten Extraktes, hier o.1 ml, ging in den Ansatz zur Blutmengenbestimmung ein. Es wurde unter gleichen Bedingungen gearbeitet, wie sie dem Erstellen der Eichkurve zugrunde lagen. Es wurden die Extinktionen von 3 Proben gemessen. Zu dem Mittelwert wurde an der Eichkurve (Abb. 1) der entsprechende Blutwert aufgesucht. Die gefundene Blutmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$x = \frac{E \cdot a}{A \cdot v}$$

x = Gefundene Blutmenge in ml

E = Volumen der Extraktionsflüssigkeit in ml

a = Abgelesener Blutwert in ml (Eichkurve)

A = Angesetzte Extraktmenge in ml

v = Grundverdünnung des Eichkurvenblutes

Die Ergebnisse zeigt Tab. 5.

Tab. 5. Blutmengenbestimmung an 1o Blutflecken (Fleckenalter 6-1o Tage), Extraktionsmittel o.o4% NH_3, angesetzte Extraktmenge o.1 ml, Extinktion = E . $1o^3$

Fleck Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o
ml Blut	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5
ml Extrakt.-Flüssigkeit	1oo	2oo	2oo	25o	3oo	1oo	15o	2oo	2oo	25o
1	47o	476	696	677	815	437	583	691	86o	9oo
2	481	48o	7o3	7oo	8o6	445	589	693	872	89o
3	493	485	7o1	695	8o5	446	582	685	862	91o
Mittelwert	481	48o	7oo	691	8o9	443	585	689	864	9oo
Abgelesener Blutwert	o.5	o.5	o.73	o.72	o.84	o.46	o.61	o.72	o.9	o.94
Gefundene Blutmenge	o.5	1.o	1.46	1.8	2.52	o.46	o.91	1.44	1.8	2.35
Ausbeute %	1oo	1oo	98	9o	1o1	92	91	96	9o	94
Fehler %	o	o	-2	-1o	+1	-8	-9	-4	-1o	-6

Bei der 2. Fleckenserie betrug das Fleckenalter 14 Tage. Da gegenüber den 6 Tage alten Flecken mit einer verminderten Extraktion zu rechnen war, wurde als Extraktionsmittel eine o.4% NH_3-Lösung verwendet. Im übrigen wurde jedoch in der gleichen Weise wie bei der 1. Fleckenserie gearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Tab. 6. Blutmengenbestimmung an 1o Blutflecken (Fleckenalter 14-16 Tage), Extraktionsmittel o.4% NH_3, angesetzte Extraktmenge o.1 ml, Extinktion = E ? 1o?

Fleck Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	2o
ml Blut	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5
ml Extrakt.-Flüssigkeit	1oo	15o	2oo	25o	3oo	1oo	1oo	2oo	5oo	6oo
1	4oo	551	682	734	71o	432	885	632	349	365
2	4o6	562	687	735	712	433	885	641	346	364
3	4o3	561	679	723	7o8	448	88o	639	349	359
Mittelwert	4o3	558	683	731	71o	437	883	637	348	363
Abgelesener Blutwert	o42	o58	o71	o76	o74	o45	o92	o66	o36	o38
Gefundene Blutmenge	o.42	o87	142	1.9	222	o45	o92	132	1.8	228
Ausbeute %	84	87	95	95	89	9o	92	88	9o	91
Fehler %	-16	-13	-5	-5	-11	-1o	-8	-12	-1o	-9

b) Blutmengenbestimmung an blutgetränkten Erdproben

In 5 weithalsige Glasgefäße wurden je 2 Eßlöffel Sand gefüllt und in 5 weitere Gläser je 2 Eßlöffel lokkere, schwarze Gartenerde. Die anschließend einpipettierten Blutmengen betrugen zwischen 1.o und 3.o ml. Eine blutfreie Sand- und Bodenprobe liefen als Leerwert mit. Die Gemische wurden 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Nach 3 Tagen wurden die ersten Proben aufbereitet. Als Extraktionsmittel diente o.o4% NH_3-Lösung. Die bluthaltigen und blutfreien Proben wurden mit jeweils 5o ml Extraktionslösung aufgeschwemmt und für etwa 3o min stehengelassen. Danach wurde der Extrakt für 1o min bei 3ooo U/min zentrifugiert. Der Bodensatz wurde noch 3mal mit abgemessenen Mengen an Extraktionsmittel aufgeschwemmt und zentrifugiert. Dann bestand makroskopisch etwa Farbgleichheit zwischen der bluthaltigen und blutfreien Probe. Der gesamte Verbrauch an Extraktionsmittel wurde wiederum notiert und der Gesamtextrakt noch einmal scharf zentrifugiert.

Bei der 1. Sand- und Bodenprobe wurde der Extrakt wegen der zu erwartenden hohen Extinktionen zunächst auf die Hälfte verdünnt, was einer Menge Extraktionslösung von 25o ml entsprach.

Wie schon bei den Blutflecken auf Textilien, wurde

auch hier mit 3 Proben eine mittlere Extinktion bestimmt, der entsprechende Blutwert an der Eichkurve aufgesucht und die gefundene Blutmenge nach der oben erwähnten Formel berechnet. Auch hier gingen o.1 ml Extrakt in den Ansatz ein. Als Blindwert diente der blutfreie Sand- und Bodenextrakt.

Die Ergebnisse sind aus Tab. 7 ersichtlich. Um eine höhere Ausbeute zu erzielen, wurde im nächsten Versuch als Extraktionsmittel nicht eine NH_3-Lösung sondern n/1o NaOH verwendet. Untersucht wurden 1 Sand- und 1 Bodenprobe mit je 1.o ml Blut. Als Blindwert diente wiederum blutfreier Sand- oder Bodenextrakt. Die Proben wurden nach der beschriebenen Methode 3mal gewaschen und zentrifugiert. Es wurden 15o ml Extraktionsflüssigkeit verbraucht. Das weitere Vorgehen entsprach dem bei den ersten Versuchen. Eine Extinktionsmessung war jedoch nicht möglich, da offenbar eine nennenswerte Bildung von Tetraguajakol nicht stattfand (s. Tab. 7).

Für die letzten zu untersuchenden Proben wurde deshalb wiederum NH_3 als Extraktionsmittel verwendet, diesmal jedoch in einer Konzentration von o.4%. Es wurden 4 Proben untersucht und zwar 2 Erdproben mit einem Blutgehalt von 1.5 und 3.o ml und 2 Sandproben mit einem Blutgehalt von 1.5 und 3.o ml. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7. Blutmengenbestimmung aus Erde und Sand, Alter der Proben: 4 Tage, Extraktionsmittel: A o.4% NH_3, B n/1o NaOH, C o.4% NH_3, Extinktion = E · 1o³
E = Erde, S = Sand

	A				B		C			
Probe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o
ml Blut	2.o	2.o	2.o	2.o	1.o	1.o	1.5	1.5	3.o	3.o
Spurenträger	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
ml Extrakt.-Flüssigkeit	25o	25o	2oo	2oo	15o	15o	15o	15o	25o	25o
1	23o	435	3o1	7o6	-	-	273	6o8	339	695
2	25o	42o	31o	695	-	-	275	6o9	345	69o
3	252	435	3o7	689	-	-	261	597	346	685
Mittelwert	244	43o	3o6	697	-	-	269	6o5	343	69o
Abgelesener Blutwert	o25	o45	o32	o72	-	-	o28	o63	o36	o72
Gefundene Blutmenge	o63	1.1	o64	1.4	-	-	o42	o95	o.9	1.8
Ausbeute %	31	55	32	72	-	-	28	63	3o	6o
Fehler %	-69	-45	-68	-28	-	-	-72	-37	-7o	-4o

4. Besprechung

Für die Guajakol-Reaktion konnten im wesentlichen die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen bestätigt werden:

1. Der Reaktionsablauf zeigt eine empfindliche Abhängigkeit von der Menge des Peroxids. Je mehr Peroxid in den Ansatz gegeben wird, desto schneller wird ein höheres Maximum der Farbentwicklung erreicht. Es ist deshalb größte Genauigkeit beim Pipettieren zu fordern.

2. Das entstehende Tetraguajakol ist nicht stabil. Bei den verwendeten Mengen und Konzentrationen wird 1o min nach Peroxidzugabe die größte Farbintensität erreicht. Nach einer Farbkonstanz von 4-5 min blaßt die Lösung langsam ab.

3. Die Guajakol-Reaktion wird - entgegen anderen Reaktionen - nicht durch die peroxidasehemmende Eigenschaft des Serums beeinflußt. Eine Guajakol-Konzentration von 27 mmol/l überdeckt das sogenannte "Auslöschphänomen". Infolgedessen ergab sich als Eichkurve eine Gerade. Die mittlere Standardabweichung der 1o Meßserien ergab den Wert = 1o.3 E · $1o^3$ und den entsprechenden Variationskoeffizienten von V = 2.5%. Dieser Fehler wäre also bei der Beurteilung der Ergebnisse von Blutmengenbestimmungen zu berücksichtigen.

Bei 2o Fleckenbestimmungen an Stoff betrug das

Ausbeutedefizit zwischen +1 und -16%, im Mittel -7.4%, je nach Alter der Flecken. Die Fehlerbreite schwankte bei den 6-1o Tage alten Flecken zwischen +1 und -1o%, was einem Mittelwert von -4.8% entspricht. Bei den zwischen 14-16 Tage alten Flecken wurde die Ausbeute geringer. Entsprechend den Extremwerten von -5 und -16% lag hier der mittlere Verlust bei -9.9%. Ein bei der 2. gegenüber der 1. Fleckenserie 1ofache Konzentrierung des Extraktionsmittels erbrachte kein besseres Ergebnis.

Die Blutmengenbestimmung aus Erdproben lieferte wesentlich schlechtere Ergebnisse. Entsprechend älteren Methoden zeigt sich auch bei der Guajakol-Reaktion eine deutliche Abhängigkeit der Ausbeute von der Beschaffenheit des Spurenträgers. Je größer die Absorptionsfähigkeit der Bodenart für Hämoglobin, desto geringer wird die Ausbeute. Für Sand ergab sich ein Ausbeutedefizit von -37% im Mittel, für humusreiche Gartenerde von -7o%. Auch hier scheint es gleichgültig, ob NH_3 als Extraktionsmittel in o.o4-oder o.4% Lösung verwendet wird. Mit n/1o NaOH als Extraktionsmittel waren überhaupt keine brauchbaren Ergebnisse zu erzielen. Offenbar wird dadurch der günstige pH-Bereich für die Guajakol-Reaktion verlassen.

SCHLEYER erzielte mit der Cyanhämiglobin-Methode Ausbeutewerte von durchschnittlich 95% für 1-7 Tage

alte Flecken und 89% für 2-3 Wochen alte Flecken. KAPPERT gibt für die Blutmengenbestimmung über den Eisengehalt eine mittlere Ausbeute von 99% für 5-64 Tage alte Flecken an (s.o.). Gegenüber diesen beiden Methoden bietet die Guajakol-Methode keine entscheidenden Vorteile. Die Ergebnisse der Blutmengenbestimmung aus Sand und Gartenerde sind schlechter als die von SCHLEYER angegebenen und wohl kaum für die gerichtsmedizinische Praxis verwendbar. Eine tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse der verschiedenen Methoden findet sich am Schluß der Arbeit bei der Besprechung der Pyridinhämochrom-Methode.

C. Die Pyridinhämochrom-Methode

I. Allgemeine Grundlagen und Literatur

Hämochrom ist ein Derivat des Hämoglobins mit 2-wertigem Eisen, bei dem der Globinanteil denaturiert oder durch eine N-haltige Base ersetzt wird. Es entsteht spontan bei Blutfäulnis und beim Rosten oder es kann durch Reduktionsmittel aus Oxyhämin hergestellt werden. Als Basen kommen zum Beispiel in Frage: Pyridin und seine Derivate, Imidazol, Hydrazine und primäre Amine. Als Reduktionsmittel eignen sich Amoniumsulfid, Natriumdithionit und Hydrazinhydrat.

Die Struktur der Hämochrome sei hier am Beispiel des Pyridinhämochroms erläutert. Pyridin ist eine tertiäre, schwache Base, dessen Molekül aus 5 in einem Sechserring zusammengeschlossenen CH-Gruppen und einem Stickstoffatom besteht. Für die Bildung des Pyridinhämochroms ist das Stickstoffatom von Bedeutung.

Das zentrale Eisenatom im Hämmolekül ist 2-wertig und hat die Koordinatenzahl 6. Mit seinen 2 Hauptvalenzen ist es an 2 Stickstoffatome des Pyrrols gebunden. Mit 2 der 4 Nebenvalenzen ist es ebenfalls an die beiden verbleibenden Stickstoffatome des Pyrrols gebunden. Die restlichen 2 Nebenvalenzen sind noch frei, und an sie können nun 2 Moleküle Pyridin koordinativ

angelagert werden. Auf diese Weise entsteht das Hämochrom (Abb. 2).

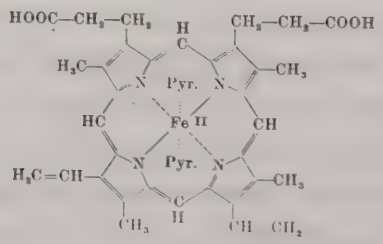

Abb. 2. Stellung des Eisenatoms (Fe^{++}) im Pyridinhämochrom-Molekül, —— Hauptvalenzen, --- Nebenvalenzen (aus HOPPE-SEYLER-THIERFELDER)

Die Hämochrome eignen sich wegen ihrer kirschroten und durch ihren Pleomorphismus ausgezeichneten Kristalle und wegen ihrer charakteristischen Absorptionsbanden gut zum Nachweis von Blut. Besonders an fauligen und hocherhitzten Blutspuren hat sich die Kristallreaktion bewährt. LIEDERWALD arbeitete mit dem Reagens nach TAKAJAMA, das aus Glukose, Wasser, 1o% NaOH und Pyridin hergestellt wird. Er erhielt noch positive Ergebnisse bei einer 2stündigen Erhitzung der Blutspur auf 2oo°C.

Die Hämochrome haben 2 scharfe Absorptionsbanden zwischen 55o und 56o nm sowie zwischen 52o und 53o nm und eine deutliche Soret-Bande bei 42o nm. Die Lage

der Banden hängt bei den Hämochromen von den basischen Resten, dem Lösungsmittel und dem Grad der Dissoziation ab (SCHWERD). FALK gibt für das Pyridinprotohämochrom folgende Werte an: α max. 557 nm, β max. 526 nm, Soret 418.5 nm.

Für quantitative Zwecke wird das Pyridinhämochrom in wässerigen, alkalischen Pyridinlösungen nach Reduktion des Hämochroms mit Natriumdithionit gemessen. PAUL und Mitarbeiter haben gefunden, daß die Absorption nicht beeinflußt wird durch Änderung der Alkalikonzentration zwischen o.o2 und o.5 mol NaOH bei konstanter Pyridinkonzentration von 25% oder bei Änderung der Pyridinkonzentration zwischen 1.2 und 6.2 mol bei konstanter NaOH-Konzentration o.1 mol.

FLINK und WATSON arbeiteten mit der Hämochrom-Reaktion zur Mengenbestimmung von Hämoglobin in Stuhl, Urin und Plasma. Sie erhielten eine Eichkurve, indem sie zu 18 Blutlösungen mit einem Hämoglobingehalt zwischen o.o6 und 3.o mg jeweils 2 ml Pyridin und 2 ml frisch bereitetes 2% $Na_2S_2O_4$ zugaben und das Volumen der Meßlösung mit 1o% NH_4OH auf 1o ml auffüllten. Die Extinktionen wurden nach 5 min bei einer Wellenlänge von 55o nm gegen einen Blindwert gemessen, bei dem die Bildung von reduziertem Hämochrom durch Zugabe von H_2O_2 ausgeschaltet war. Bei Recovery-Bestimmungen ergab sich ein Fehler 1o% für Plasma und Urin. Bei Stuhluntersuchungen

betrug die Ausbeute zwischen 75 und 95%.

DE DUVE bestimmte Hämoglobin- und Myoglobinmengen aus Muskelextrakten mit der Pyridinhämochrom-Methode. Er empfiehlt, das Hämoglobin nicht erst mit Alkali aufzuspalten und dann mit Pyridin die Umwandlung in das entsprechende Hämochrom vorzunehmen, sondern mit einer Reagentienlösung zu arbeiten, die vorher aus Pyridin und NaOH hergestellt wird. Als optimale Mengen gibt er an: 1oo ml Pyridin, 3o ml 1 mol NaOH und Auffüllen der Lösung auf 3oo ml mit Aqua dest. Für quantitative Messungen füllte der Autor 1 ml Hb-Lösung und 3 ml Reagentienlösung in eine 1 cm-Küvette. Durch vorsichtiges Mischen mit einem Glasstab entstand oxydiertes Pyridinhämochrom, eine relativ stabile Verbindung. Unmittelbar vor der spektrophotometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 557.5 nm wurde ein Überschuß von festem $Na_2S_2O_4$ hinzugegeben und durch Aufschütteln gelöst. Das so entstandene reduzierte Pyridinhämochrom sollte nur für 5 bis 1o min stabil sein, und die Messung mußte daher schnell gemacht werden. DE DUVE gibt für diese Methode einen Fehler von $\pm$ 2% an.

II. Eigene Versuche

1. Vorversuche an Hand der Literatur

a) Nach der Methode von FLINK und WATSON

Reagentien:

1. Blutlösung: aus zitriertem Rindervollblut wurde mit Aqua dest. eine Verdünnung von 1:1oo hergestellt
2. 3 mol Pyridin (etwa 25%)
3. 2% $Na_2S_2O_4$ (Natriumdithionit)
4. 1o% NH_4OH

Im 1. Versuch wurden 1.o ml Blutlösung, 2.o ml Pyridin, 2 ml $Na_2S_2O_4$ und 5 ml NH_4OH in der angegebenen Reihenfolge in ein Reagensglas pipettiert und vorsichtig gemischt. Es stellte sich sofort eine intensiv kirschrote Färbung ein. Nach 5 min wurden die Extinktionen des entstandenen Farbkomplexes in einem Wellenlängenbereich zwischen 5oo und 58o nm im Abstand von 1o nm gegen eine Reagentienlösung ohne Blutzusatz gemessen. Die Werte sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tab. 8. Extinktionsmessung ($E \cdot 1o^3$) von Pyridinhämochrom in einem Wellenlängenbereich zwischen 5oo und 58o nm

nm	5oo	51o	52o	53o	54o	55o	56o	57o	58o
$E \cdot 1o^3$	36o	356	4o5	4o8	324	383	45o	332	29o

Der entstandene Farbkomplex zeigt entsprechend den Angaben in der Literatur eine schwächere Absorptionsbande zwischen 52o nm und 53o nm (β) und eine scharfe bei 56o nm (α).

Bei einem 2. Ansatz unter gleichen Bedingungen wie beim vorhergehenden Versuch wurde die Dauer der Farbintensität im α-Maximum bei der angegebenen Wellenlänge von 558 nm festgestellt. Die Änderung der Extinktion wurde in einem Zeitraum zwischen 5 und 6o min nach dem Mischen der Meßlösung im Abstand von 5 min gemessen. Wie aus Tab. 9 ersichtlich, besteht für etwa 2o min nach dem Ansatz Farbkonstanz. Später wird die Farbintensität langsam geringer.

Tab. 9. Messung der Extinktion (E . $1o^3$) von Pyridinhämochrom zwischen 5 und 6o min nach Ansetzen der Meßlösung bei einer Wellenlänge von 558 nm

t	5	1o	15	2o	25	3o	35	4o	45	5o	55	6o
E . $1o^3$	43o	431	428	426	42o	415	411	396	39o	39o	382	368

Zum Nachweis der Gültigkeit des LAMBERT-BEERschen Gesetztes wurden in 6 Reagensgläser Blutmengen zwischen o.5 und 3.o ml im Abstand von o.5 ml pipettiert und ad 3.o ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Je 2.o ml 3 mol Pyridin und 2% $Na_2S_2O_4$ wurden hinzugegeben und die Volumina der Meßlösungen ad 1o.o ml mit 1o% NH_4 aufgefüllt. 5 min nach dem Mischen wurden die Extinktionen bei der Wellenlänge 558 nm gegen einen Reagentienblindwert ohne Blutzusatz gemessen (Tab. 1o). Es scheint eine direkt proportionale Beziehung zwischen der angesetzten Blutmenge und der gemessenen Extinktion zu bestehen.

Tab. 1o. Extinktionsmessung (E . $1o^3$) von Pyridinhämochrom mit Blutmengen zwischen o.5 und 3.o ml

Blutl. (1:1oo in ml)	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5	3.o
E . $1o^3$	163	411	59o	8o5	99o	125o

b) Nach der Methode von DE DUVE

Reagentien:

1. Aus Rindervollblut wurde mit Aqua dest. eine Lösung von 1:1oo hergestellt.
2. Das Pyridin-Reagens wurde nach DE DUVE bereitet: 1oo ml wurden mit 3o ml 1 mol NaOH kräftig gemischt und mit Aqua dest. auf 3oo ml aufgefüllt.
3. $Na_2S_2O_4$ wurde im Gegensatz zu DE DUVE nicht in Pulverform verwendet, sondern wegen der exakteren Dosierbarkeit als 2% wässerige Lösung in den Ansatz gegeben.

Von der Blutlösung 1:1oo wurden 1.o ml in ein Reagensglas pipettiert und mit 3.o ml Pyridin-NaOH-Lösung und 1.o ml $Na_2S_2O_4$ gemischt. Auch in diesem Fall bildete sich sofort die charakteristische kirschrote Verfärbung. Es wurde 5 min abgewartet und dann die Extinktion in dem Wellenlängenbereich zwischen 5oo und 6oo nm gemessen (Tab. 11).

Tab. 11. Extinktion ($E \cdot 1o^3$) von Pyridinhämochrom (nach DE DUVE): 1.o ml Blut 1:1oo, 3.o ml Pyridin-NaOH-Reagens, 1.o ml 2% $Na_2S_2O_4$

nm	5oo	51o	52o	525	53o	54o	55o	555	56o	57o	58o	59o	6oo
$E \cdot 1o^3$	159	191	26o	285	253	183	334	498	48o	137	62	48	42

Die gemessenen Werte lassen auch hier eine schwächere β-Absorptionsbande zwischen 52o und 53o nm und eine scharfe α-Bande zwischen 55o und 56o nm erkennen.

Im Folgendem wurde die Dauer der Farbkonstanz im α-Maximum bei 558 nm beobachtet. Die Meßlösung wurde wie beim vorhergehenden Versuch angesetzt und die Änderung der Farbintensität in dem Zeitraum zwischen 5 und 6o min gemessen. Wie aus Tab. 12 ersichtlich, wird das Maximum der Farbintensität schnell erreicht. Nach etwa 15 min Farbkonstanz beginnt die Lösung langsam abzublassen. Nach 6o min hat die Farbintensität um etwa 3% abgenommen.

Tab. 12. Farbintensität von Pyridinhämochrom im Zeitraum zwischen 5 und 6o min (t) nach dem Mischen (Extinktion = E · $1o^3$)

t	5	1o	15	2o	25	3o	35	4o	45	5o	55	6o
E · $1o^3$	5o1	5oo	5oo	496	491	49o	49o	488	486	485	483	483

Sodann wurde die Abhängigkeit der Extinktion von der zugegebenen Blutmenge festgestellt. Dazu wurden von der Vollblutverdünnung 1:1oo o.1-1.o ml in 1o Reagensgläser pipettiert und auf 1.o ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Es wurden je 3.o ml Pyridin-NaOH-Reagens und 1.o ml 2% $Na_2S_2O_4$ hinzugegeben. 5 min nach dem Mischen wurden die Extinktionen bei 558 nm gegen einen

Reagentienblindwert ohne Blutzusatz gemessen. Zum Vergleich wurde eine 2. Meßreihe angesetzt. Es wurden jedoch die Blutmengen verdoppelt. Sie betrugen diesmal also zwischen o.2 und 2.o ml. Sonst wurde nach den gleichen Bedingungen wie beim vorhergehenden Versuch gearbeitet. Wie aus Tab. 13 ersichtlich, scheint in beiden Fällen eine direkt proportionale Beziehung zwischen gemessener Extinktion und angesetzter Blutmenge zu bestehen. Bei der 2. Versuchsanordnung wird jedoch ein breiterer Bereich auf der Skala des Meßgerätes überdeckt, was für die spätere Fleckenuntersuchung vorteilhafter ist. Außerdem ist die Bedeutung eines Pipettierfehlers um so geringer, je größer der Abstand zwischen den einzelnen Blutmengen ist, d.h. je kleiner der prozentuale Anteil der zuviel oder zuwenig pipettierten Blutmenge von der zwischen 2 Blutchargen liegenden Menge ist. Daher wurden in den folgenden Versuchen Blutmengen zwischen o.2 und 2.o ml im Abstand von o.2 ml verwendet.

Tab. 13. Beziehung zwischen angesetzter Blutmenge (1:1oo) und gemessener Extinktion (E · $1o^3$), a) o.1-1.o ml, b) o.2-2.o ml

ml	a)	o.1	o.2	o.3	o.4	o.5	o.6	o.7	o.8	o.9	1.o
E · $1o^3$	a)	65	123	191	261	32o	4o5	483	525	615	664
ml	b)	o.2	o.4	o.6	o.8	1.o	1.2	1.4	1.6	1.8	2.o
E · $1o^3$	b)	1o9	214	32o	418	525	642	747	855	945	1o6o

Es wurden nun, um die Tauglichkeit der bisher beschriebenen Methodik für das Erstellen einer Eichkurve festzustellen, von jeder Blutcharge jeweils 1o Meßlösungen angesetzt und diese 5 min nach dem Mischen hintereinander gemessen. Es fiel auf, daß bei der 5. Meßserie (1.o ml) die einzelnen Werte sehr stark voneinander abwichen und ab der 6. Serie zeigte sich nach Zusatz des Dithionits nur eine schwache, kurz anhaltende oder gar keine Rotfärbung mehr (Tab. 14).

Es wurde vermutet, daß die 2% $Na_2S_2O_4$-Lösung, die bereits mehrere Stunden alt war, inzwischen unbrauchbar geworden war. FLINK und WATSON geben für ihre Arbeitsvorschrift an, daß eine frisch bereitete Lösung verwendet werden solle. Auch FALK empfiehlt, nur von SO_2-Geruch freies $Na_2S_2O_4$-Pulver zu verarbeiten und das Material zu verwerfen, sobald die Partikelchen beginnen, zusammenzukleben.

Für die folgenden Versuche wurde deshalb die Dithionitlösung jedesmal unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt. Wie die Werte der ersten Meßserien zeigen (Tab. 14), scheint die Methode sonst die Bedingungen für eine Eichkurve hinreichend zu erfüllen.

Tab. 14. 1o Meßreihen mit je 1o Proben: o.2-2.o ml Blut (1:1oo), 3 ml Pyridin-NaOH-Reagens, 1.o ml $Na_2S_2O_4$, Messen der Extinktion ($E \cdot 1o^3$) nach 5 min bei 558 nm gegen einen Reagentienblindwert

ml Blut 1:1oo	o.2	o.4	o.6	o.8	1.o	1.2	1.4	1.6	1.8	2.o
1	98	195	3oo	395	435	-	-	-	-	-
2	91	19o	292	399	472	-	-	-	-	-
3	9o	215	3oo	4oo	396	-	-	-	-	-
4	72	19o	3oo	383	45o	-	-	-	-	-
5	83	191	3o3	395	48o	-	-	-	-	-
6	8o	185	298	398	5o3	-	-	-	-	-
7	9o	186	29o	4o1	424	-	-	-	-	-
8	81	189	287	387	39o	-	-	-	-	-
9	83	182	286	396	385	-	-	-	-	-
1o	97	185	291	398	392	-	-	-	-	-
Mittelwert	87	191	295	395	-	-	-	-	-	-

2. Ermittlung einer Eichkurve

Die Eichkurve zur späteren Blutmengenbestimmung mittels der Pyridinhämochrom-Reaktion wurde im Prinzip nach der Methode von DE DUVE ermittelt. Der Übersichtlichkeit halber seien hier noch einmal die einzelnen Schritte kurz zusammengestellt. Für die Eichkurve wurde natürlich das gleiche Blut verwendet, mit

dem die Blutflecken und Erdproben hergestellt wurden.

1. o.2-2.o ml Rindervollblut 1:1oo
2. Auffüllen des Volumens auf 2.o ml mit Aqua dest.
3. 3.o ml Pyridin-NaOH-Reagens
4. 1.o ml 2% $Na_2S_2O_4$ (frisch angesetzt)
5. Mischen
6. Nach 5 min Messen der Extinktion bei der Wellenlänge von 558 nm gegen einen Reagentienblindwert ohne Blutzusatz

Von jeder Blutcharge wurden 1o Proben angesetzt und auch hier die Standardabweichung (G) und der Variationskoeffizient (V) berechnet. Aus den 1o gemessenen Werten wurden jeweils die Mittelwerte errechnet und in einem Koordinatensystem gegen die entsprechenden Blutmengen aufgetragen (Abb. 3). Wie aus Tab. 15 und Abb. 3 ersichtlich, ergab sich als Eichkurve eine Gerade.

Tab. 15. 1o Meßreihen mit je 1o Proben: o.2-2.o ml Rindervollblut (1:1oo), 3.o ml Pyridin-NaOH-Reagens, 1.o ml 2% $Na_2S_2O_4$. Nach 5 min Messen der Extinktionen ($E \cdot 1o^3$) bei 558 nm

ml Blut 1:1oo	o.2	o.4	o.6	o.8	1.o	1.2	1.4	1.6	1.8	2.o
1	112	212	329	421	521	638	74o	855	94o	1o5o
2	112	214	319	42o	525	641	758	852	95o	1o4o
3	1o9	218	334	413	526	636	743	845	945	1o7o
4	11o	217	32o	425	525	639	738	848	95o	1o5o
5	112	2o8	327	42o	518	649	742	85o	95o	1o8o
6	111	228	32o	423	524	642	746	851	955	1o5o
7	111	211	328	421	52o	634	743	842	96o	1o5o
8	112	214	329	418	528	639	744	855	955	1o4o
9	113	215	325	415	529	635	738	853	95o	1o5o
1o	11o	212	325	419	526	642	752	844	955	1o5o
Mittel-wert	111	215	326	42o	524	64o	744	85o	951	1o53
σ ($E \cdot 1o^3$)	1.2	5.2	4.6	3.4	3.3	4.2	6.o	4.4	5.6	12
V in %	1.1	2.4	1.4	o.8	o.6	o.7	o.8	o.5	o.6	1.1

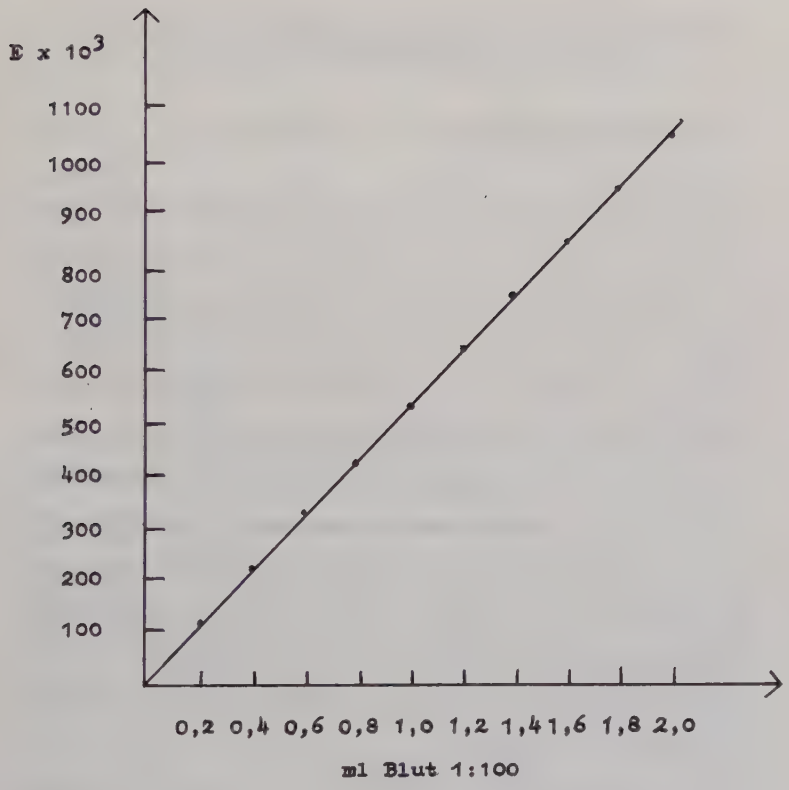

Abb. 3. Eichkurve für die Pyridinhämochrom-Reaktion

3. Hauptversuche

a) Blutmengenbestimmung von Blutflecken auf Textilien

Um einen Vergleich zwischen der Guajakol- und der Pyridinhämochrom-Reaktion anstellen zu können, wurden die Blutmengenbestimmungen in beiden Fällen mit den Eluaten derselben Flecken gemacht. Bei der Pyridinhämochrom-Reaktion ging wiederum ein Aliquot des zentrifugierten Fleckenextraktes von 1.o ml in dem Ansatz ein. Gemäß den Bedingungen, nach denen die Eichkurve erstellt wurde, wurde aus den gemessenen Extinktionen von 3 angesetzten Meßlösungen der Mittelwert bestimmt. Der entsprechende Blutwert wurde auf der Abszisse des Koordinatensystems aufgesucht und die gesuchte Blutmenge mit Hilfe der oben angegebenen Formel (s. Guajakol-Reaktion) errechnet.

Die Ergebnisse sind in den Tab. 16 und 17 zusammengestellt.

Tab. 16. Blutmengenbestimmung an 1o Blutflecken (Fleckenalter 6-1o Tage), Extraktionsmittel o.o4% NH_3, angesetzte Extraktmenge 1.o ml, Extinktion = E · $1o^3$

Fleck Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o
ml Blut	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5
ml Extrakt.-Flüssigkeit	1oo	2oo	2oo	25o	3oo	1oo	15o	2oo	2oo	25o
1	271	29o	398	415	4o5	26o	32o	372	5o2	51o
2	266	289	396	4o7	41o	258	331	376	5o6	5oo
3	272	287	391	4o8	412	267	318	37o	5o1	511
Mittelwert	269	288	395	41o	4o9	262	323	373	5o3	5o7
Abgelesener Blutwert	o.5	o54	o74	o78	o77	o51	o.6	o.7	o94	o96
Gefundene Blutmenge	o5o	1o8	148	195	231	o51	o9o	14o	188	24o
Ausbeute %	1oo	1o8	99	98	92	1o2	9o	93	94	96
Fehler %	o	+8	-1	-2	-8	+2	-1o	-7	-6	-4

Tab. 17. Blutmengenbestimmung an 1o Blutflecken (Fleckenalter 14-16 Tage), Extraktionsmittel o.4% NH_3, angesetzte Extraktmenge 1.o ml, Extinktion = E ? 1o^3

Fleck Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	2o
ml Blut	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5	o.5	1.o	1.5	2.o	2.5
ml Extrakt.-Flüssigkeit	1oo	15o	2oo	25o	3oo	1oo	1oo	2oo	5oo	6oo
1	255	346	36o	41o	4oo	242	496	375	217	2o4
2	261	35o	355	4o2	4o5	232	499	375	218	2o3
3	257	341	358	397	398	245	49o	376	211	2o8
Mittelwert	257	345	357	4o3	4o1	24o	495	375	215	2o5
Abgelesener Blutwert	o.5	o65	o69	o76	o75	o45	o92	o.7	o.4	o39
Gefundene Blutmenge	o.5	o97	138	1.9	225	o45	o92	1.4	2.o	234
Ausbeute %	1oo	98	92	95	9o	9o	92	93	1oo	94
Fehler %	o	-2	-8	-5	-1o	-1o	-8	-7	o	-6

b) Blutmengenbestimmung an blutgetränkten Erdproben

Auch bei den Blutmengenbestimmungen an Erdproben wurden die gleichen Eluate untersucht, wie bei der Guajakol-Reaktion. Auch diesmal gingen 1.o ml des Extraktes in dem Ansatz ein. Das weitere Vorgehen entsprach dem bei der Fleckenbestimmung mit dem Unterschied, daß nicht gegen einen einfachen Reagentienblindwert gemessen wurde, sondern gegen eine Reagentienlösung mit blutfreiem Boden- oder Sandextrakt. Dadurch sollte eine möglicherweise vorhandene Trübung der Meßlösung, die nicht zu Lasten des Blutgehaltes ging, ausgeschaltet werden. Im Unterschied zur Guajakol-Reaktion wurde bei der 1. Erd- oder Sandprobe der Extrakt nicht auf die Hälfte verdünnt (s. dort), weil in diesem Falle Werte zu erwarten waren, die im günstig ablesbaren Bereich der Meßskala lagen. In der Tabelle erscheint deshalb der Betrag des Originalvolumens von 125 ml. Die Ergebnisse sind aus Tab. 18 zu ersehen.

Tab. 18. Blutmengenbestimmung aus Erde und Sand (Alter der Proben 4-6 Tage), angesetzte Extraktmenge 1.o ml, Extraktionsmittel A = o.o4% NH_3, B = n/1o NaOH, C = o.4% NH_3, E = Erde, S = Sand, Extinktion = E · $1o^3$

	A				B				C	
Probe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o
ml Blut	2.o	2.o	2.o	2.o	1.o	1.o	1.5	1.5	3.o	3.o
Spurenträger	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
ml Extrakt.-Flüssigkeit	125	125	2oo	2oo	15o	15o	15o	15o	25o	25o
1	263	672	295	42o	182	3o1	185	41o	31o	471
2	261	68o	286	426	19o	3o1	19o	4o2	316	481
3	256	683	293	427	185	31o	17o	398	319	481
Mittelwert	26o	678	291	424	186	3o4	181	4o3	315	478
Abgelesener Blutwert	o48	126	o54	o.8	o35	o57	o34	o76	o59	o.9
Gefundene Blutmenge	o6o	157	1o8	16o	o53	o85	o51	114	148	225
Ausbeute %	3o	79	54	8o	53	85	34	76	49	75
Fehler %	-7o	-21	-46	-2o	-47	-15	-66	-24	-51	-25

4. Besprechung

Beim Erstellen der Eichkurve und bei den folgenden Blutmengenbestimmungen wurde im Prinzip nach der Methode von DE DUVE gearbeitet. Einmal ist die Ausführung dieser Reaktion etwas einfacher als die der von FLINK und WATSON beschriebenen und zweitens ist die von DE DUVE angegebene Fehlbestimmung für Hämoglobin von ± 2% günstiger, als die von ± 1o% bei FLINK und WATSON.

Bei den Vorversuchen erwies es sich als erforderlich, zur Reduktion des oxydierten Hämochroms nur eine frisch bereitete $Na_2S_2O_4$-Lösung zu verwenden. Die angesetzte Lösung bleibt nur etwa 2 h verwendungsfähig. Später wird die zuverlässige und vollständige Reduktion durch den Zerfall des $Na_2S_2O_4$-Moleküls verhindert.

Das entstehende Pyridinhämochrom ist kein stabiler Komplex. Bei der photometrischen Beobachtung des Reaktionsablaufes bestand 15-2o min Farbkonstanz.

Als Eichkurve, zu der Rindervollblut in einer Verdünnung von 1:1oo verwendet wurde, ergab sich auch für die Pyridinhämochrom-Reaktion eine Gerade. Die mittlere Standardabweichung betrug $\sigma = 4.9\ E \cdot 1o^{3}$, was einem mittlerem Variationskoeffizienten von V = 1.o% entspricht. Dieser Wert kann bei Blutmengenbestimmungen wegen seiner geringen Größe praktisch vernachlässigt

werden.

Die Ergebnisse der Blutmengenbestimmung aus Stoff-Flecken waren zufriedenstellend. Für 2o untersuchte Flecken betrug der mittlere Ausbeuteverlust 4.2%. Es zeigt sich eine leichte Abhängigkeit vom Alter der Blutspur. Bei der 1. Fleckenserie schwankten die Werte zwischen +8 und -1o%, was einem Mittelwert von -2.8% entspricht. Bei der 2. Serie nahm das Ausbeutedefizit auf -5.6% zu.

Die Bodenuntersuchungen lieferten, verglichen mit denen der Guajakol-Reaktion, etwas bessere Ergebnisse. Jedoch wurden auch hier keine wünschenswerten Ausbeutewerte erreicht. Für Sand betrug die Ausbeute im Mittel 79%, während bei lockerer Gartenerde nur knapp die Hälfte der eingebrachten Blutmenge wiederbestimmt werden konnte. Die Pyridinhämochrom-Reaktion wird offenbar durch die stark alkalische Extraktion der Blutspur mit n/1o NaOH nicht störend beeinflußt.

Bei einem Vergleich mit den Methoden von SCHLEYER und von KAPPERT gilt für die Pyridinhämochrom-Reaktion im wesentlichen das für die Guajakol-Reaktion bereits Gesagte. Die Ausbeutedefizite für Blutmengenbestimmungen aus Stoff-Flecken lagen zwar etwas unter den von SCHLEYER für entsprechende Flecken angegebenen, jedoch über denen von KAPPERT. Aber besonders die Ergebnisse der Blutmengenbestimmungen aus Sand und Gartenerde waren ent-

täuschend. Eine vergleichende Zusammenstellung der Ergebnisse der verschiedenen Methoden findet sich in Tab. 19.

Tab. 19. Ergebnisse von Blutmengenbestimmungen mit verschiedenen photometrischen Methoden (modifiziert nach SCHLEYER)

Methode	Spurenträger	Alter der Blutspur (Tage)	Ausbeutedefizit in % Mittelwert	Streuung
Guajakol-Reaktion	Textilien	6-1o	-4.8	+1/-1o
		14-16	-9.9	-5/-16
	Sand	4	-37	-28/-4o
	Gartenerde	4	-7o	-68/-72
Pyridin-hämochrom-Reaktion	Textilien	6-1o	-2.8	+8/-1o
		14-16	-5.6	o/-1o
	Sand	4	-21	-15/-25
	Gartenerde	4	-56	-46/-7o
Bestimmung als Cyan-hämiglobin (SCHLEYER)	Textilien	1- 7	-5	o/-12
		14-21	-11	-9/-13
		1-3 Mon.	-19	-1o/-23
	Sand	o-25	-11	-2/-28
	Gartenerde	2- 5	-27	-15/-36
Bestimmung über den Eisengehalt (KAPPERT)	Textilien	5-64	-1	+11/-25

D. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die spektrophotometrische Blutmengenbestimmung aus blutgetränkten Textilien und verschiedenen Erdproben mittels der Guajakol-Reaktion (Peroxidase-Reaktion) und als Pyridinhämochrom zu versuchen.

Bei der Guajakol-Methode wurde mit Rindervollblut in der Verdünnung von 1:1ooo, dem Guajakol-Reagens nach OWEN, BETTER und HOBAN und einer o.o5 mol H_2O_2-Lösung gearbeitet. Die Reaktion zeigte eine sehr empfindliche Abhängigkeit von der Blut- und der Peroxidmenge. Es ist deshalb auf größtmögliche Genauigkeit beim Pipettieren zu achten. Bei der Pyridinhämochrom-Methode wurde im wesentlichen nach den Vorschriften von DE DUVE gearbeitet. Die Blutverdünnung war hier 1:1oo. Es ist darauf zu achten, daß zur Reaktion nur eine frisch angesetzte Na-Dithionitlösung verwendet wird. Die Blutmengenbestimmungen wurden in beiden Fällen anhand von Eichkurven mit bekannten Blutmengen gemacht. Sowohl für die Guajakol-, als auch die Pyridinhämochrom-Methode ergab sich als Eichkurve eine Gerade. Das von anderen Autoren für die Peroxidase-Reaktionen beschriebene "Auslöschphänomen" wurde durch die gewählte Guajakol-Konzentration von 27 mmol/l überdeckt.

Es wurden 2o Blutflecken in Textilien, 5 blutge-

tränkte Erd- und 5 Sandproben untersucht. Das Untersuchungsmaterial wurde nach der von SCHLEYER beschriebenen Methodik aufbereitet.

Die Ausbeutewerte betrugen für die Guajakol-Methode in Abhängigkeit vom Alter der Blutspur für Stoff-Flecken im Mittel 93% bei einer Streuung zwischen 1o1 und 84%. Zu berücksichtigen ist ein Variationskoeffizient der Methodik von ± 2.5%. Für die Pyridinhämochrom-Methode ergab sich bei einer Streuung zwischen 1o8 und 9o% ein mittlerer Ausbeutewert von 95%. Der Variationskoeffizient von ± 1% kann vernachlässigt werden. Bei den Blutmengenbestimmungen aus Erde oder Sand waren die Ergebnisse in beiden Fällen enttäuschend, und sie sind für die gerichtlich-medizinische Praxis nicht zu gebrauchen. Die hohen Ausbeuteverluste sind durch die starke Absorption der eingebrachten Blutmenge an die Trägermaterialien zu erklären.

E. Literatur

CONNELL, G. and O. SMITHIES: Human Haptoglobins: Estimation and Purification. Biochem. J. 72, 115, 1959

FALK, J.: Porphyrins and Matallporphyrins, Amsterdam (Elsvier) 1964

FLINK, E. and C. WATSON: A Method for the Quantitative Determination of Hemoglobin and Related Heme Pigments in Feces, Urine and Blood Plasma. J. biol. Chem. 146, 171, 1942

HANSEN, R., von: Bestimmung der Blutmenge in Blutflecken auf Textilien mittels einer Benzidinmethode. Diss. Marburg 1967

HOPPE-SEYLER-THIERFELDER Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse IV/2, Berlin (Springer) 196o

KAPPERT, R.: Versuche zur Blutmengenbestimmung an Blutflecken mittels ihres Eisengehaltes. Diss. Marburg 1969

LIEDERWALD, K.: Die Azetonchlorhäminreaktion und die Hämochromogenreaktion an hocherhitztem Menschenblut. Diss. Bonn 1948

OWEN, J., F. BETTER and J. HOBAN: A Simple Method for the Determination of Serum Haptoglobins. J. clin. Pathol. 13, 163, 196o

PAUL, K., H. THEORELL and A. AKESON: The Molar Light Absorption of Pyridine Ferroprotoporphyrin. Acta chem. Scand. 7, 1284, 1953

SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung, Lübeck (Schmidt-Römhild) 1966

SCHLEYER, F.: Photometrische Mengenbestimmung angetrockneter Blutspuren aus ihrem Hämoglobingehalt, bestimmt als Cyanhämiglobin. Blut 17, 2o, 1968

SCHWERD, W.: Studien über das Verhalten von Hämatin in alterndem Blutserum. Z. gerichtl. Med. 46, 772, 1958

SMITH, H. and J. OWEN: The Determination of Haptoglobins in Normal Human Serum. Biochem. J. 78, 723, 1961

Herrn Prof. Schleyer danke ich für die Überlassung des Themas und die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit am Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg und seine Beratung bei den Versuchen und der Abfassung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 28. Mai 1943 wurde ich als viertes Kind des damaligen Studienrates Heinrich van Wasen und seiner Ehefrau Martha, geb. Böttcher in Weidenau geboren.

Von Ostern 1950 bis Ostern 1954 besuchte ich die Volksschule, dann bis 1963 das Staatlich-Neusprachliche Gymnasium in Betzdorf, wo ich am 20 Februar 1963 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1963 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Köln. Dort legte ich am 27. April 1964 die naturwissenschaftliche- und am 24. März 1966 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Studium der klinischen Medizin an der Universität Marburg.

Am 31. Juli 1969 bestand ich an der Universität Marburg die ärztliche Staatsprüfung.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Köln:

Debuch, Faillard, Feher, Hirsch, Jaumann, Kirchner, Klenk, Kuhn, Kummer, Menke, Ortmann, Schneider, Stegemann, Tischendorf, Vogel

in Marburg:

Beckmann, Behrend, Berendes, Blum, Bommer, Buchholz, Dittrich, Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Heuser, Hildebrandt, Ihm, Jacob, Knauff, Kreutz, Kunz, Lang, Linneweh, Löhr, du Mesnil de Rochemont, Mann, Martini, Marx, Nocke, Oehme, Oehmig, Pots, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Salfeld, Sauer, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Siess, Staib, Straub, Streicher, Strohmeyer, Voss, Willenbockel